

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
11. März 2004 (11.03.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/020659 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

Herzogenaurach (DE). STANZEL, Manfred [DE/DE];
Tausenstr. 100, 91056 Erlangen (DE). ZEININGER,
Heinrich [DE/DE]; Tannenstr. 6, 90587 Obermichelbach
(DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/002483

(22) Internationales Anmeldedatum:

23. Juli 2003 (23.07.2003)

(74) Gemeinsamer Vertreter: SIEMENS AKTIENGE-
SELLSCHAFT; Postfach 22 16 34, 80506 München
(DE).

(25) Einreichungssprache:

Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache:

Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): CN, JP, US.

(30) Angaben zur Priorität:

102 36 459.1

8. August 2002 (08.08.2002) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US*): SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE];
Wittelsbacherplatz 2, 80333 München (DE).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): FEUCHT, Hans-Di-
eter [DE/DE]; Eschenweg 7, 71272 Renningen (DE).
GUMBRECHT, Walter [DE/DE]; In der Rote 1, 91074

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: RECOGNITION LAYERS MADE OF HYDROGEL BASED ON POLYACRYLAMIDE FOR USE IN BIOSENSOR
TECHNOLOGY

(54) Bezeichnung: ERKENNUNGSSCHICHTEN AUS HYDROGEL AUF DER BASIS VON POLYACRYLAMID FÜR DIE BI-
OSENSORIK

(57) Abstract: The invention relates to a hydrophilic immobilization layer for biosensors made of a radically cross-linkable hydrogel based on polyacrylamide, whereby the starting composition comprises acrylamide, cross-linkers, radical initiator(s), at least one comonomer having reactive linker groups and optionally comprises softeners or the inventive layer is made of a photostructured hydrogel based on polyacrylamide, whereby the starting composition comprises acrylamide, cross-linkers, photoinitiators, at least one film former, at least one comonomer having reactive linker groups and optionally comprises softeners.

(57) Zusammenfassung: Hydrophile Immobilisierungsschicht für Biosensoren aus einem radikalisch vernetzbaren Hydrogel auf Basis von Polyacrylamid, wobei die Ausgangszusammensetzung Acrylamid, Vernetzungsmittel, Radikalinitiator(en), wenigstens ein Comonomer mit reaktiven Linkergruppen und gegebenenfalls Weichmacher umfasst, oder aus einem fotostrukturierten Hydrogel auf Basis von Polyacrylamid, wobei die Ausgangszusammensetzung Acrylamid, Vernetzungsmittel, Fotoinitiatoren, wenigstens einen Filmbildner, wenigstens ein Comonomer mit reaktiven Linkergruppen und gegebenenfalls Weichmacher umfasst.

WO 2004/020659 A1

Beschreibung

ERKENNUNGSSCHICHTEN AUS HYDROGEL AUF DER BASIS VON POLYACRYLAMID FÜR DIE BIOSENSORIK

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft eine Immobilisierungsschicht für Biosensoren sowie ihre Verwendung zur Erzeugung von biosensorischen Erkennungsschichten, insbesondere zur Erzeugung von sogenannten DNA-Chips.
- 10 In der modernen biologischen Analysetechnik, aber auch in der medizinischen Diagnostik, werden in zunehmendem Maße Biosensoren eingesetzt, bei denen ein biologisches Erkennungssystem mit einem physikalischen Transducer verknüpft ist. Unter Erkennungssystemen versteht man biologische Erkennungsmoleküle, wie Antikörper, Enzyme, Nucleinsäuren und dergleichen, welche über eine sogenannte Immobilisierungsschicht an einem Träger (Transducer) gebunden sind. Als Transducer werden hauptsächlich kalorimetrische, piezoelektrische, optische und elektrochemische Prinzipien verwendet.
- 20 Die Erkennungssysteme, respektive ursprünglich die Immobilisierungsschichten, werden dabei meist in annähernd zwei-dimensionalen Schichten auf den Transducersystemen immobilisiert. Die Immobilisierung der Erkennungsmoleküle kann durch
- 25 kovalente Bindungen, durch Affinitätswechselwirkung aber auch durch hydrophil/hydrophobe Wechselwirkungen erfolgen. Aus Stabilitätsgründen werden kovalente Bindungen bevorzugt, jedoch kommt auch die Bildung stabiler Komplexe, wie zum Beispiel Biotin/Avidin, erfolgreich zum Einsatz. Einen guten
- 30 Überblick über den Aufbau annähernd zwei-dimensionaler biologischer Erkennungsschichten geben I. Willner, E. Katz: "Redoxproteinschichten auf leitenden Trägern - Systeme für bioelektronische Anwendungen" in Angew. Chem. 2000, 112, S. 1230-69.
- 35 Bei Transducer-Oberflächen, welche NH- oder OH-Gruppen enthalten, werden die biologischen Funktionsträger, d.h. die Erkennungsmoleküle, häufig durch Alkoxysilane, welche sogenann-

te Linkergruppen enthalten, aber auch mit Hilfe von Cyanurchlorid oder Carbodiimid immobilisiert. Zur Ausrüstung goldhaltiger Transduceroberflächen werden mit Thiolalkyl gelabelte Erkennungsmoleküle eingesetzt, die über Schwefel-Gold-Bindungen in Form von sogenannten Self-Assembly-Schichten auf der Transduceroberfläche immobilisiert werden. Ein interessanter Ansatz zur Immobilisierung von Nucleinsäuren auf Transduceroberflächen ist die photochemisch unterstützte Synthese von Affymetrix (Light-directed spatially addressable parallel chemical synthesis, S.P.A. Fodor et al., Science 10 251, 767-773 (1991)).

Zur Steigerung der Empfindlichkeit von Biosensoren sowie zur Optimierung der Reproduzierbarkeit der damit erhaltenen Mess-
15 ergebnisse ist der Einsatz dreidimensionaler Immobilisierungsschichten für die biologischen Erkennungsmoleküle sinnvoll. Die Firma Schleicher & Schüll GmbH bietet unter dem Namen FASTTM Slides DNA-Chips an, in welchen die Fänger-Oligos in einer drei-dimensionalen Nitrocellulose-Membran immobilisiert sind (BioMolecular Screening, Catalog 2001, intern. 20 Edit. Fa. Schleicher & Schüll).

In der WO 00/43539 ist der Aufbau einer dreidimensionalen DNA-Erkennungsschicht durch Immobilisierung der DNA-Fänger-Sonden in Form von Polymer-Brushes beschrieben. 25

Von Timofeev et al. wird ein chemisch modifiziertes, radikalisch vernetztes Polyacrylamid beschrieben, das zum Beispiel für die Immobilisierung von Fänger-Oligos eingesetzt werden
30 kann (E. N. Timofeev et al., Regioselective Immobilization of Short Oligonucleotides to Acrylic Copolymer Gels, Nucleic Acids Research, 1966, Vol.24, No. 16, 3142-3148). Hier werden als Kopplungsgruppen im Hydrogel Amino- oder Aldehydgruppen verwendet. Aldehyd- bzw. Amino-funktionalisierte Fänger-
35 Oligos können an diese Kopplungsgruppen unter reduktiven Reaktionsbedingungen kovalent immobilisiert werden. Das bedeutet aber, dass neben der eigentlichen Kopplungsreaktion zwi-

5 schen Amino- und Aldehydgruppe, bzw. umgekehrt, ein zusätzlicher Reduktionsschritt unter Einsatz von Reduktionsmitteln erforderlich ist. Weitere von Timofeev et al. beschriebene Methoden zur chemischen Aktivierung des vernetzten Polyacrylamids erfordern ebenfalls zusätzliche Reaktionsschritte in der Polymermatrix.

10 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Erzeugung einer hydrophilen Immobilisierungsschicht für biosensorische Anwendungen auf Basis eines Hydrogels sowie die Verwendung solcher Immobilisierungsschichten zur Erzeugung von Erkennungsschichten durch kovalente Einkopplung biologischer Erkennungsmoleküle.

15 Die vorliegende Erfindung löst diese Aufgabe unter Verwendung von radikalisch vernetzten oder fotostrukturierten Hydrogelen als Immobilisierungsschicht. Solche Hydrogele sind in den deutschen Patentanmeldungen "Radikalisch vernetzbare Zusammensetzung zur Erzeugung einer Hydrogelschicht" bzw. "Fotostrukturierbare Zusammensetzung zur Erzeugung einer Hydrogelschicht" (Aktenzeichen noch nicht bekannt) der Anmelderin beschrieben.

25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist demnach einmal eine hydrophile Immobilisierungsschicht für Biosensoren aus einem radikalisch vernetzten Hydrogel auf Basis von Polyacrylamid, wobei die Ausgangszusammensetzung Acrylamid, Vernetzungsmittel, Radikalinitiatoren, wenigstens ein Comonomer mit reaktiven Linkergruppen und gegebenenfalls Weichmacher sowie sonstige Additive umfasst.

35 Gegenstand der vorliegenden Verbindung ist auch eine hydrophile Immobilisierungsschicht aus einem fotostrukturierten Hydrogel auf Basis von Polyacrylamid, wobei die Ausgangszusammensetzung Acrylamid, Vernetzungsmittel, Fotoinitiatoren, wenigstens einen Filmbildner, wenigstens ein Comonomer

mit reaktiven Linkergruppen und gegebenenfalls Weichmacher sowie andere Additive umfasst.

Die erfindungsgemäßen Systeme erlauben den Aufbau von Sensor-
5 arrays mit biologischen Erkennungsmolekülen in einer dreidimensionalen Matrix in hoher Integrationsdichte.

Bevorzugte Ausführungsformen bzw. Zusammensetzungen der erfindungsgemäßen hydrophilen Immobilisierungsschichten ergeben
10 sich aus den Unteransprüchen 3 bis 10.

Den Zusammensetzungen können gegebenenfalls weitere Komponenten beigefügt werden, welche die Mischbarkeit der beteiligten Monomere und der Initiatoren gewährleisten. Zur Herabsetzung
15 der Oberflächenspannung können handelsübliche Additive verwendet werden.

Nach Schichtherstellung auf einem Transducersystem und thermischer bzw. Fotovernetzung oder Fotopolymerisation oder Fotostrukturierung bzw. Polymerisationsstrukturierung wird ein
20 mit Wasser quellbares Hydrogel erhalten, in das unter Verwendung der Linkergruppen biologische oder chemische Erkennungsmoleküle für analytische oder diagnostische Anwendungen unter Erhalt ihrer Funktionsfähigkeit eingekoppelt werden können.
25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist demzufolge auch die Verwendung der Immobilisierungsschichten zur Herstellung von biosensorischen Erkennungsschichten durch (kovalentes) Einkuppeln bzw. Immobilisieren von chemischen oder biologischen Erkennungsmolekülen, wobei die Erkennungsmoleküle vorzugsweise Fänger-Oligonukleotide sind.
30

Grundsätzlich kann die Ausgangszusammensetzung zur Erzeugung der Hydrogelschicht (Immobilisierungsschicht) mit allen modernen Beschichtungstechnologien auf die geeigneten Träger
35 aufgebracht werden. Bevorzugt werden jedoch Spin-Coating sowie Dispensieren angewendet.

Die Eigenschaften der zu erzeugenden Hydrogelschicht bezüglich Hydrophile, Vernetzungsdichte, Quellbarkeit, etc. lassen sich in weiten Bereichen durch die Art der verwendeten Ausgangskomponenten, deren Verhältnis zueinander und letztendlich der Art der Schichtbildung variieren.

Die Hydrogelmatrix kann an die zum Einsatz kommenden biologischen Erkennungsmoleküle, insbesondere im Hinblick auf die Vernetzungsdichte, angepasst werden. Die Vernetzungsdichte wird durch Art und Konzentration der verwendeten Vernetzermoleküle, wie Acryl- und/oder Methacrylverbindungen, insbesondere Methylenbis(meth)acrylamid und/oder Dimethacrylsäureester, wie Tetraethylenglycoldimethacrylat, gesteuert werden.

Die Hydrogelmischung kann auch an das für den speziellen Anwendungszweck bevorzugte Beschichtungsverfahren angepasst werden.

Für Spin-Coating kommt zum Einen die Verwendung eines polymeren Filmbildners, wie Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylamid und/oder Polyhydroxymethacrylat, in Frage. Zum anderen können hochsiedende Lösungsmittel, wie z. B. Ethylenglykol, für die Hydrogelmischung verwendet werden, die beim Spin-Coating nicht vollständig verdampfen und so als Weichmacher in der Schicht verbleiben. Der Restlösemittelgehalt kann dann durch einen Prebake-Schritt vor der Vernetzung gezielt weiter reduziert und somit u.a. die Polymerisationsausbeute bzw. die resultierende Schichtdicke gesteuert werden. Gegebenenfalls können zusätzliche Weichmachersysteme, wie Di- und/oder Triethylenglykol, zugesetzt werden.

Bei der Schichtbildung durch Dispensieren wird die Hydrogelmischung in Lösung je nach Transducerdimensionen in Tropfen in einer Größe von einigen Mikrolitern bis zu einem Nanoliter aufgebracht. Für das Dispensieren werden hochsiedenden Lösungsmittel, die eine ausreichend lange Lebensdauer des Tropfens

an der Spitze der Dispensierkanüle aufweisen, verwendet. Damit wird das Dosieren und Absetzen des Tropfens reproduzierbar. Andererseits darf der Siedepunkt des Lösungsmittels nicht zu hoch sein, um ein ausreichend rasches Abdampfen des
5 Lösungsmittels aus dem abgesetzten Tropfen zu ermöglichen. Gegebenenfalls ist hier ein Tempersschritt zur Steuerung des Gehalts an Restlösemittel erforderlich. Erfindungsgemäß kommen für das Dispensieren der Hydrogelmischung bevorzugt Dimethylformamid und/oder Ethylenglykol zum Einsatz.

10

Die Hydrogelmischung kann in Schicht- oder Spotform auf Transducer- oder Trägeroberflächen aus Metall, Glas, Silicium, Siliciumdioxid, Siliciumnitrid oder Kunststoff aufgebracht werden. Es können auch Oberflächen mit Topographie,
15 die aus unterschiedlichen Materialien bestehen, wie z. B. Interdigitalelektrodenarrays auf Siliciumnitrid als Passivierung, beschichtet werden. Die Beschichtung von Flächen schließt auch die Beschichtung innerer Oberflächen von Mikrokanälen oder Nanotubes ein. Die zu beschichtenden Oberflächen
20 sind gegebenenfalls mit einem Haftvermittler beschichtet.

Die Polymerisation und Vernetzung der Hydrogelschicht erfolgt durch thermische oder UV-Initiierung. Bei UV-Initiierung kann auch eine Strukturierung der Hydrogelschicht durch Kontakt-
25 bzw. Proximitybelichtung durch eine Maske erfolgen. Die Hydrogelschicht arbeitet hier wie ein Negativ-Resist. Im bestrahlten Bereich wird polymerisiert und vernetzt. In den abgedunkelten Bereichen findet keine Reaktion statt. Die hier befindliche Hydrogelmischung wird in einem Entwicklungsschritt wieder vom Substrat abgelöst. Hilfskomponenten wie
30 polymere Filmbildner oder Weichmacher können durch Extraktion aus der vernetzten Hydrogelschicht entfernt werden. Dieser Schritt kann unter Umständen zeitgleich mit dem eigentlichen Ausrüstungsschritt erfolgen.

35

Die bioglogischen oder chemischen Erkennungssysteme werden vorzugsweise aus wässriger Lösung, aus wässriger Pufferlösung

oder aus Gemischen polarer Lösungsmittel mit Wasser auf die Immobilisierungsschicht aufgebracht. Das Aufbringen erfolgt durch Auftropfen oder Aufspotten/Aufdispensieren. In Nanotubes oder Mikrokanäle kann das Heranbringen der Lösung mit den biologischen oder chemischen Erkennungsmolekülen an die vernetzte Hydrogelschicht auch durch den Transport durch das fluidische System selbst erfolgen. Für die zielgenaue Beladung von Messspots werden vorteilhafterweise vernetzte Hydrogelspots verwendet, die von einem Schutzring umgeben sind.

10

Für das kovalente Ankoppeln der biologischen oder chemischen Erkennungsmoleküle, die mit einer zur im vernetzten Hydrogel vorhandenen Linkergruppe passenden Kopplungsgruppe versehen sind, kann je nach Reaktivität ein Tempersschritt erforderlich sein. Um das Austrocknen der Hydrogelschicht während der Kopplungsreaktion zu verhindern, kann in einer Klimakammer gearbeitet werden. Besonders geeignet für die Ankopplung an die Linkergruppen Epoxyd und Maleinsäureanhydrid sind Aminoalkylgruppen.

15

Patentansprüche

- 1.. Hydrophile Immobilisierungsschicht für Biosensoren aus
einem radikalisch vernetzten Hydrogel auf Basis von Po-
5 lyacrylamid, wobei die Ausgangszusammensetzung Acryla-
mid, Vernetzungsmittel, Radikalinitiator(en), wenigstens
ein Comonomer mit reaktiven Linkergruppen und gegebenen-
falls Weichmacher umfasst.
- 10 2. Hydrophile Immobilisierungsschicht aus einem foto-
strukturierten Hydrogel auf Basis von Polyacrylamid, wo-
bei die Ausgangszusammensetzung Acrylamid, Vernetzungs-
mittel, Fotoinitiator(en), wenigstens einen Filmbildner,
wenigstens ein Comonomer mit reaktiven Linkergruppen und
15 gegebenenfalls Weichmacher umfasst.
3. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach Anspruch 1 oder
2, dadurch gekennzeichnet, dass das Vernet-
zungsmittel eine Acryl- und/oder Methacrylverbindung
20 ist.
4. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet, dass das Vernetzungs-
mittel Methylenbis(meth)acrylamid und/oder Dimethacryl-
25 säureester ist.
5. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach einem der An-
sprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass
das Comonomer mit reaktiven Linkergruppen Maleinsäurean-
30 hydrid und/oder Glycidyl(meth)acrylat ist.
6. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach einem der An-
sprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass
der Weichmacher Mono-, Di- und/oder Triethylenglycol
35 ist.

7. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Ausgangszusammensetzung, in einem polaren, mit Wasser mischbaren Lösungsmittel vorliegt.
- 5 8. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Lösungsmittel Dimethylformamid ist.
- 10 9. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach einem der Ansprüche 2 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Filmbildner Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylamid und/oder Polyhydroxymethacrylat ist.
- 15 10. Hydrophile Immobilisierungsschicht nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass sie auf Transducer- oder Trägeroberflächen aus Metall, Glas, Silicium, Siliciumdioxid, Siliciumnitrid, Kunststoff oder auf Oberflächen mit Topographie erzeugt ist.
- 20 11. Verwendung der Immobilisierungsschicht nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung von biosensorischen Erkennungsschichten durch (kovalentes) Einkuppeln bzw. Immobilisieren von chemischen oder biologischen Erkennungsmolekülen.
- 25 12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Erkennungsmoleküle Fänger-Oligonukleotide sind.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 03/02483

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q C08F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 31148 A (BEUHLER ALLYSON J ;MCGOWEN JOHN A (US); MOTOROLA INC (US)) 2 June 2000 (2000-06-02) abstract page 3, line 24 -page 4, line 7 page 5, line 1 -page 19, line 25 claims 1-26	1-11
X	WO 00 43539 A (BIOCHIP TECHNOLOGIES GMBH ;RUEHE JUERGEN (DE); PRUCKER OSWALD (DE)) 27 July 2000 (2000-07-27) cited in the application abstract	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 November 2003

Date of mailing of the international search report

28/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Madlener, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 03/02483

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 596 038 A (SUBRAMANIAM RAJ) 21 January 1997 (1997-01-21) abstract column 5, line 42 -column 6, line 27 examples 1-12 claims 1-12 ---	1-11
A	US 5 428 076 A (ROE DONALD C) 27 June 1995 (1995-06-27) the whole document ---	1-11
A	US 5 972 375 A (TRUTER PATRICIA-ANN ET AL) 26 October 1999 (1999-10-26) the whole document ---	1-11
A	VASILISKOV A V ET AL: "FABRICATION OF MICROARRAY OF GEL-IMMOBILIZED COMPOUNDS ON A CHIP BYCOPOLYMERIZATION" BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, NATICK, US, vol. 27, no. 3, September 1999 (1999-09), pages 592,594,596-598,600,602,604,606, XP000849476 ISSN: 0736-6205 the whole document ---	1-11
A	HEALEY B G ET AL: "FIBEROPTIC DNA SENSOR ARRAY CAPABLE OF DETECTING POINT MUTATIONS" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 251, no. 2, 5 September 1997 (1997-09-05), pages 270-279, XP000703841 ISSN: 0003-2697 the whole document ---	1-11
A	TIMOFEEV E ET AL: "Binding specificity and stability of duplexes formed by modified oligonucleotides with a 4096-hexanucleotide microarray" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 29, no. 12, June 2001 (2001-06), pages 2626-2634, XP002961131 ISSN: 0305-1048 the whole document -----	1-11



Europäisches
Patentamt
European Patent
Office
Office européen
des brevets

Description of WO2004020659

Print

Copy

Contact Us

Close

Result Page

Notice: This translation is produced by an automated process; it is intended only to make the technical content of the original document sufficiently clear in the target language. This service is not a replacement for professional translation services. The esp@cenet® Terms and Conditions of use are also applicable to the use of the translation tool and the results derived therefrom.

< Desc/Cims PAGE NUMBER 1>

Description RECOGNITION LAYERS FROM HYDRAULIC GEL ON the BASIS OF POLYACRYLAMID FOR the BIO SENSOR TECHNOLOGY the available invention concerns a Immobilisierungsschicht for bio sensors as well as its use for the production of biosensory recognition layers, in particular to the generation of so-called DNA chips.

In modern biological analysis technique, in addition, in the medical diagnostics, bio sensors is used increasingly, with which a biological recognition system is linked with a physical Transducer. Unter der Erkennungssystemen one understands biological Erkennungsmoleküle, like anti-bodies, enzymes, Nucleinsäuren and such egg chen, which are bound over a so-called immobilization layer at a carrier (Transducer). When Transducer who mainly calorimetric, piezoelectric, optical and electro-chemical principles uses.

The Erkennungssysteme, respectively originally the real estate Schichtungsschichten, are usually siert thereby in approximately two dimensional layers on the Transducersystemen real estate. The immobilization of the recognition molecules can take place via kovalente connections, via affinity reciprocal effect in addition, through hydrophilically/hydrophobe reciprocal effects. Preferred for stability reasons kovalente connections, ever nevertheless comes also the education of stable complexes, how to the with play < RTI ID=0.0> Biotin/Avidin, < /RTI> successfully to the employment. A good overview of the structure approximately two-dimensional biologischer recognition layers give I. Willner, E. Katz: "RH doxproteinschichten on leading carrier systems for bio electronic applications " in Angew. Chem. one. 2000,112, S. 1230-69.

With Transducer surfaces, which ent NH-or OH-groups holds, the biological function carriers become, D. h. the he of identification molecules, frequently by Alkoxysilane, which sogenann

< Desc/Cims PAGE NUMBER 2>

groups of left of width unit contain, in addition, by Cyanurchlorid or Carbodiimid immobilizes. For equipment goldhaltiger Transduceroberflächen are inserted with Thiolalkyl of gelabelte recognition molecules, which are immobilized over sulfur gold connections in the form of so-called Self assembly layers on the Transduceroberfläche. Inter+it a santer beginning for the immobilization of Nucleinsäuren on Transduceroberflächen is the photochemically supported Synthesis of Affymetrix (Light directed spatially addressable parallel chemical synthesis, S. P. A. Fodor et al., Science < RTI ID=0.0> 251,767-773 (1991)). < /RTI>

For the increase of the sensitivity of bio sensors as well as for the optimization of the reproductibility the measuring of results received thereby is the employment three-dimensional real estate Schichtungsschichten for the biological recognition molecules sense fully. The company Schleicher & Schüll GmbH offers FASTTM Slides DNA chip, in which the Fänger Oligos in a three-dimensional Nitrocellulose diaphragm real estate is siert under the well men (BioMolecular Screening, Catalog 2001, internally).

Edit. Company Schleicher & Schüll).

In the WHERE 00/43539 is the structure of a three-dimensional DNA Erkennungsschicht by immobilization of the DNA Fänger probes in the form of polymer Brushes described.

Of Timofeev et al. a chemically modified, radikalisch interlaced Polyacrylamid, is described which can be used for example for the immobilization of Fänger Oligos (E. N. Timofeev et al., Regioselective Immobilization OF Short Oligonucleotides on acrylic copolymer of gel, Nucleic Acids Research, 1966, volume. 24, No. 16,3142-3148). Here as groups of couplings in the hydraulic gel Amino or groups of aldehydes are used. Aldehyd-bzw. fänger Amino funktionalisierte < RTI ID=0.0> Oligos< /RTI> can to these groups of couplings under reductive RH action conditions kovalent be immobilized. Bedeu it tet however that apart from the actual coupling reaction zwi

< Desc/Cims PAGE NUMBER 3>

schen Amino-und group of aldehydes, and/or. turned around, an auxiliary left cher reduction step using reducing agents is necessary. Further of Timofeev et al. described methods for the chemical activation of the interlaced Polyacryl of amide require likewise additional reaction steps in the polymer matrix.

Task of the available invention is the production of a hydrophilic immobilization layer for biosensory Anwen fertilizes on basis of a hydraulic gel as well as the use of such immobilization layers for the production of recognition ski CH ten by kovalente linking of biological recognition moleküle.

The available invention solves this task using radikalisch interlaced or fotostrukturierter hydraulic gels as immobilization layer. Such hydraulic gels are in the German patent applications " radikal interlacable Zusammensetzung for the production of a hydraulic gel layer " and/or photostrukturable composition for the production hydraulic gel of a layer?

(file reference not yet well-known) the Anmelderin wrote.

The subject of the available invention is therefore once a hydrophilic immobilization layer for bio sensors from a radical interlaced hydraulic gel on basis of Polyacrylamid, whereby the output composition acrylamide, cross-linking with covers tel, radical initiators if necessary, at least a Comonomer with reakti ven groups of left and softeners as well as sons tige additives.

The subject of the available connection is also a hydrophilic immobilization layer from one photo-structures ten hydraulic gel on basis of Polyacrylamid, whereby the output composition acrylamide, cross linkage material, Fotoinitiato ren, at least one film former, at least a Comonomer

< Desc/Cims PAGE NUMBER 4>

with reactive groups of left and softeners as well as other additives covers if necessary.

The systems according to invention permit the structure of sensor array with biological recognition molecules in one three-those mensionalen to matrix in high device complexity.

Preferred execution forms and/or. Compositions of the he find-in accordance with-eaten hydrophilic immobilization layers result from the Unteransprüchen 3 to 10.

The compositions can if necessary further Komponen ten to be attached, which ensures the miscibility of the monomers involved and the initiators. For the reduction of the surface tension commercial additives en can turn to become.

After layer production on a Transducersystem and ther mixers and/or. Photo cross-linking or photo polymerization or Fo tostrukturierung and/or. Polymerization structuring will receive a hydraulic gel pourable with water, into which under whom dung of the groups of left biological or chemical recognition molküle for analytic or diagnostic applications under receipt of their operability can be linked.

The subject of the available invention is therefore also the use of the immobilization layers for the production of biosensory recognition layers by (kovalentes) in couples and/or. Immobilizes from chemical or biological recognition molecules, whereby the recognition molecules are vorzugswei SE Fänger Oligonukleotide.

In principle the output composition can be applied for the production of the hydraulic gel layer (immobilization layer) with all mo dernen coating technologies on the suitable carriers. Preferred however spin Coating are used like Dispensieren.

< Desc/Cims PAGE NUMBER 5>

The characteristics of the hydraulic gel layer reference which can be produced lich hydrophilic one, cross-linking density, swelling capability, etc. leaves itself within wide ranges by the kind the used out course components, whose relationship to each other and last the latter vary lich the kind of the Schichtbildung.

The hydraulic gel matrix can be adapted to the which is used biology of schen recognition molecules, in particular regarding the cross-linking density. The cross-linking density is < by kind and concentration of the used; RTI ID=0.0> Vernetzermo < /RTI> leküle, like Acryl-und/or Methacrylverbindungen, insbeson dere Methylenbis (meth) acrylamide and/or Dimethacrylsäu more reester, like Tetraethylenglycoldimethacrylat, steered who that.

The hydraulic gel mixture can be adapted also to coating processes preferential for the special on Idiom purpose.

For spin Coating comes on the one hand the use polyme ren < RTI ID=0.0> Film former, < /RTI> like Polyvinylpyrrolidon, Polyacrylamid and/or Polyhydroxymethacrylat, in question. On the other hand high-boiling solvents ▲ top can, like z. B. Ethyl glycol, for the hydraulic gel mixture to be used, which evaporate with the spin Coating not completely and remain in such a way as softeners in the layer. The remainder solvent content can then by a Prebake step before cross-linking aimed further redu ziert and thus and. A. the polymerization yield and/or. the RH sultierende layer thickness to be steered. If necessary additional softener systems, like Di-und/or tri ethyl glycol, can be added.

During the Schichtbildung by Dispensieren the hydraulic gel mixture in solution is applied depending upon Transducerdimensionen in drops in a size of some micro litres up to a nano-litre. For the Dispensieren high-boiling release means becomes, the one sufficiently long life span of the drop

< Desc/Cims PAGE NUMBER 6>

at the point of the Dispensierkanüle exhibit, used. Since with becomes proportioning and setting the drop reproducing off bar. On the other hand the boiling point of the solvent may not be to high, in order to make a sufficiently rapid evaporation possible of the solvent from the set off drop.

If necessary here an annealing step is necessary for the controlling of the content of remainder solvents. Kom the methyl form amide and/or ethyl glycol men according to invention to the employment for the Dispensieren of the hydraulic gel mixture prefers.

The hydraulic gel mixture knows in layer or Spotform on Transducer or carrier surfaces made of metal, glass, Silici over, silicon dioxide, silicon nitride or plastic aufge broke to become. Also surfaces with topography, which consist of different materials, can do like z. B. In terdigitalelektrodenarrays on silicon nitride as passive IE rung, to be coated. The coating of surfaces includes also the coating of internal surfaces of micro channels or Nanotubes. The surfaces which can be coated are if necessary coated with an adhesion mediator.

The polymerization and cross-linking of the hydraulic gel layer take place via thermal < RTI ID=0.0> or UV-Initiierung.< /RTI> With < RTI ID=0.0> UV-Initiierung< /RTI> also a structuring of the hydraulic gel layer can by contact and/or. Proximitybelichtung by a mask take place. The hydraulic gel layer works here like a negative resist. In radiated range one polymerizes and one interlaces. In the off darkened ranges no reaction takes place. The hydraulic gel mixture here present in a development walked again replaced from the substrate. < RTI ID=0.0> Hilfskomponenten< /RTI> as polymere film former or softener can be removed by extraction from the interlaced

hydraulic gel layer. This step can take place perhaps at the same time with the actual equipment step.

The biologischen or chemical Erkennungssysteme preferably become from aqueous solution, from aqueous buffer solution

< Desc/Cims PAGE NUMBER 7>

or from mixtures of polar solvents with water on the immobilization layer applied. Applying effected through < RTI ID=0.0> Auftropfen< /RTI> or < RTI ID=0.0> Aufspotten/Aufdispensieren.< /RTI> Into nano-doing bes or micro-channels can a bringing of the solution with the biological or chemical recognition molecules to the en wetted hydraulic gel layer also via transport via the fluid system to take place. For the goal-exact Bela dung of Messspots favourable-proves interlaced hydraulic gelspots used, which is surrounded by a protection ring.

For kovalente coupling of the biological or chemical recognition molecules, which are provided with group of couplings a fitting the group of left existing in the interlaced hydraulic gel, an annealing step can be necessary depending upon reactivity. In order to prevent a draining of the hydraulic gel layer during the coupling reaction, can be worked in a climatic chamber. Particularly suitably for the coupling to the groups of left Epoxyd and maleic acid anhydride are revision modification NO alkyl groups.